

УДК 582.923.5:581.192:547.94.

# РЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ $\text{Ca}^{2+}$ -АЛЬГИНАТ-ХИТОЗАНОВОГО НОСИТЕЛЯ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *AROSYNACEAE*

С.Н. Ромашко, О.В. Молчан, В.М. Юрин

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь,*

*e-mail: svetlan\_rom@mail.ru*

## Введение

Иммобилизованные клетки характеризуются способностью к повышенному по сравнению со свободными суспензионными клетками синтезу и экскреции вторичных метаболитов, а также возможностью длительного субкультивирования благодаря сохранению высокой жизнеспособности и метаболической активности в течение длительного времени [1–3]. Эти преимущества иммобилизованных клеток открывают широкие перспективы для разработки экономически целесообразных технологий получения лекарственных препаратов с помощью регулируемого биосинтеза [1, 2]. Для иммобилизации растительных клеток используются различные гель-образующие вещества природного и синтетического происхождения. Так, в качестве носителей применяются соли альгиновой кислоты, хитозан, каррагинан, агар (агароза), пектин, полиакриамид и др. [2, 3].

Наиболее часто используемым приемом иммобилизации является кальций-альгинатное микрокапсулирование. Альгинаты являются биосовместимыми полианионными полисахаридами, которые в комплексе с ионами бивалентных металлов образуют довольно прочные гели. Сверхсинтез и спонтанное высвобождение продуктов вторичного метаболизма иммобилизованными в кальций-альгинатных гелях клетками были продемонстрированы в работах ряда авторов [1–4].

Перспективным иммобилизующим агентом является хитозан, который представляет собой поликатионный аминополисахарид. Данное соединение также может быть регулятором роста и индуктором устойчивости растений [5]. Предполагается его элиситор-подобная активность в отношении нативных растений [4]. Кроме того, входящий в состав инкапсулирующих агентов, хитозан может проявлять антибактериальные и противовирусные свойства [5]. В качестве самостоятельного иммобилизующего носителя хитозан используется редко из-за довольно жестких условий его гель-образования.

Представляя собой положительно заряженный поликатионит, хитозан может реагировать с отрицательно заряженными молекулами альгината с образованием полиэлектролитных комплексов [5]. В результате этой реакции образуются полиэлектролитные сетки, которые являются перспективными иммобилизующими носителями. Применение этой технологии открывает широкие возможности в области создания уникальных альгинат-хитозановых контейнеров для капсулирования клеток, ферментов и других важнейших биомолекул, пролонгированного высвобождения биологически активных соединений, адресной доставки, защиты и хранения биоматериала. Уникальные характеристики получаемых полимерных гидрогелей, несомненно, найдут широкое применение в фармакологии, медицине, катализе, косметической промышленности и других областях производства [5].

Однако микрокапсулирование в альгинат-хитозановых гранулах используется в основном только для иммобилизации физиологически-активных биомолекул. Например, была показана возможность инкапсулирования альбумина и интерлейкина-2 в альгинат-хитозановые микрокапсулы [6, 7] и гемоглобина в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановом носителе [7].

Как известно, именно из растений получают более трети всех лекарственных субстанций, используемых в медицинской практике. Поэтому кроме иммобилизации биомолекул, актуальным является изучение инкапсулированных растительных клеток как

уникальных биореакторов, продуцирующих комплекс физиологически активных соединений. Влияние хитозан-альгинатного носителя на физиолого-биохимические характеристики клеток суспензионных культур лекарственных растений изучено в гораздо меньшей степени.

Среди растений семейства *Aposynaceae* следует выделить *Catharanthus roseus* (L.) G. Don и *Vinca minor* (L.), которые содержат высоко ценные фармакологически активные терпеновые моно- и бис-индольные алкалоиды и фенольные соединения. Алкалоиды, продуцируемые в *Catharanthus roseus*, обладают антиаритмическим, гипотензивным, седативным, транквилизирующим эффектами и противоопухолевой активностью [8]. Препараты, полученные на основе сырья *Vinca minor*, являются активаторами церебрального метаболизма и, также, предполагается их антинеопластическая активность [9]. Среди фенольных соединений особое значение имеют флавоноиды, обладающие антиоксидантными, противовирусными, антиишемическими и другими фармакологически важными свойствами [10].

При изучении иммобилизованных в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатном геле клеток суспензионной культуры *Catharanthus roseus* основное внимание уделялось накоплению и экскреции терпеновых индольных алкалоидов. Влияние иммобилизации на морфо-физиологические параметры клеток *Vinca minor* практически не исследовалось. Действие  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых носителей на характеристики суспензионной культуры указанных растений не изучалось.

Таким образом, представлялось актуальным установление закономерностей влияния микрокапсулирования клеток суспензионной культуры растений семейства *Aposynaceae* в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановом носителе на ростовые характеристики, содержание фенольных соединений и флавоноидов.

#### **Методы исследования**

**Объектами исследований** являлись суспензионные и иммобилизованные клетки растений рода *Vinca* L. – *Vinca minor* (барвинок малый) и рода *Catharanthus* G. Don. – *Catharanthus roseus* (катарантус розовый).

#### **Получение суспензионных культур**

Суспензионную гетеротрофную культуру получали из каллуса рыхло типа, инициированного из листовых эксплантов растений. Каллусную ткань переносили в жидкую среду инкубации Мурасиге и Скуга (МС), содержащую кинетин, бензиламинопурин (БАП) и нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрациях 1, 0,2 и 1 мг/л, соответственно, при соотношении 1:4 (масса/объем). Культивирование проводили при 25 °С в термостате в темноте на шейкере роторного типа при 120 об/мин. Пересадку осуществляли каждые 20 дней.

#### **Процедура иммобилизации клеток**

Процедуру иммобилизации клеток проводили согласно методике, описанной ранее с некоторыми изменениями [3]. Для получения  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных гранул к суспензионной культуре клеток добавляли 2% раствор альгината натрия (250 сПз) (соотношение суспендированных клеток к раствору альгината составляло 1/2 (масса/объем)), тщательно перемешивали и добавляли по каплям (с помощью шприца) в 100 мМ раствор  $\text{CaCl}_2$  (рН 5,6).

Для получения  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранул, хитозан (15,7 кДа) предварительно растворяли в 2% HCl и использовали для приготовления конечного раствора концентраций 0,05%, рН 5,6. К раствору хитозана добавляли альгинат натрия (250 сПз, 2%). Гранулы получали, как описано выше.

Оставляли гранулы на 20–30 минут для стабилизации, затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Промытые гранулы переносили в среду МС, содержащую кинетин, БАП и НУК в концентрациях 1, 0,2 и 1 мг/л, соответственно. Иммобилизованные клетки инкубировали в термостате в темноте при температуре 25°С на шейкере роторного типа при 120 об/мин.

### Количественное определение содержания фенольных соединений и флавоноидов

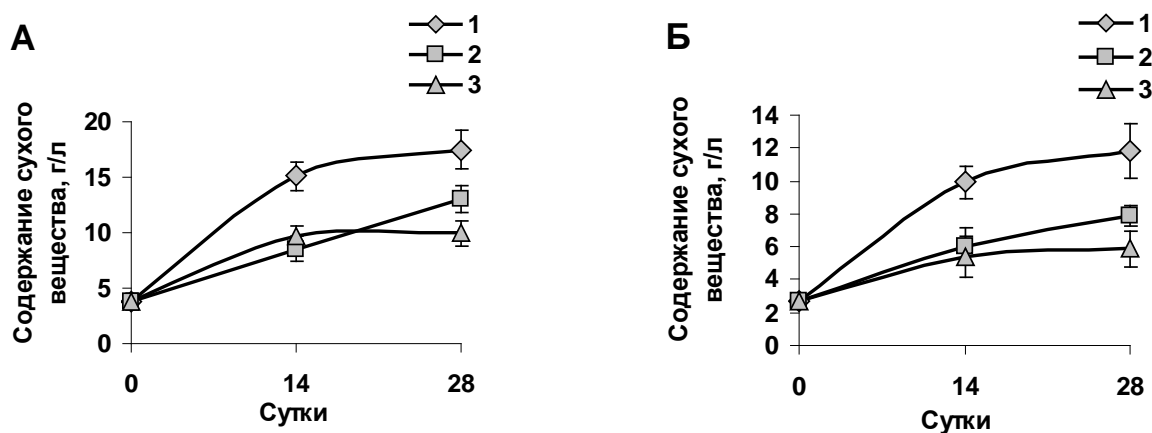
Количественное определение содержания фенольных соединений и флавоноидов проводили по общепринятым методикам [11]. Для определения сумм фенольных соединений и флавоноидов в свободных и иммобилизованных клетках ткань гомогенизировали в 70% этаноле (при соотношении ткани и экстрагента 1:10). Экстракт центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость использовали для анализа.

Определение содержания суммы растворимых фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту проводили спектрофотометрически с использованием реактива Фолина-Дениса. Раствор для анализа содержал 20% полученного экстракта, 1% реактива Фолина-Дениса и 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Оптическую плотность полученного раствора определяли с помощью спектрофотометра Varian Cary 50 (Varian, Австралия) при длине волны 720 нм.

Определение суммы флавоноидов проводили в пересчете на гликозид кверцетина (Sigma, США). Раствор для анализа содержал 2% полученного экстракта, 0,66%  $\text{AlCl}_3$  в этаноле. Оптическую плотность полученного раствора измеряли с помощью спектрофотометра Varian Cary 50 (Varian, Австралия) при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения использовали раствор алюминия хлорида в этаноле.

### Результаты и обсуждение

Важной характеристикой культур *in vitro* является ее рост. В связи с этим были получены кривые роста свободных и иммобилизованных клеток *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных и  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых капсулах (рисунок 1А,Б). Анализ ростовых характеристик исследуемых культур *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* показал, что наиболее интенсивное накопление биомассы наблюдается в свободных клетках по сравнению с инкапсулированными на протяжении всего ростового цикла. На 14-е сутки культивирования достоверных различий в ростовых характеристиках инкапсулированных клеток в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановом и  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатном носителях не выявлено. При этом установлено, что на 28-е сутки инкубации, интенсивность роста иммобилизованных клеток в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах была на 30 и 34% меньше по сравнению с инкапсулированными клетками в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных носителях для *Catharanthus roseus* и *Vinca minor*, соответственно (рисунок 1).



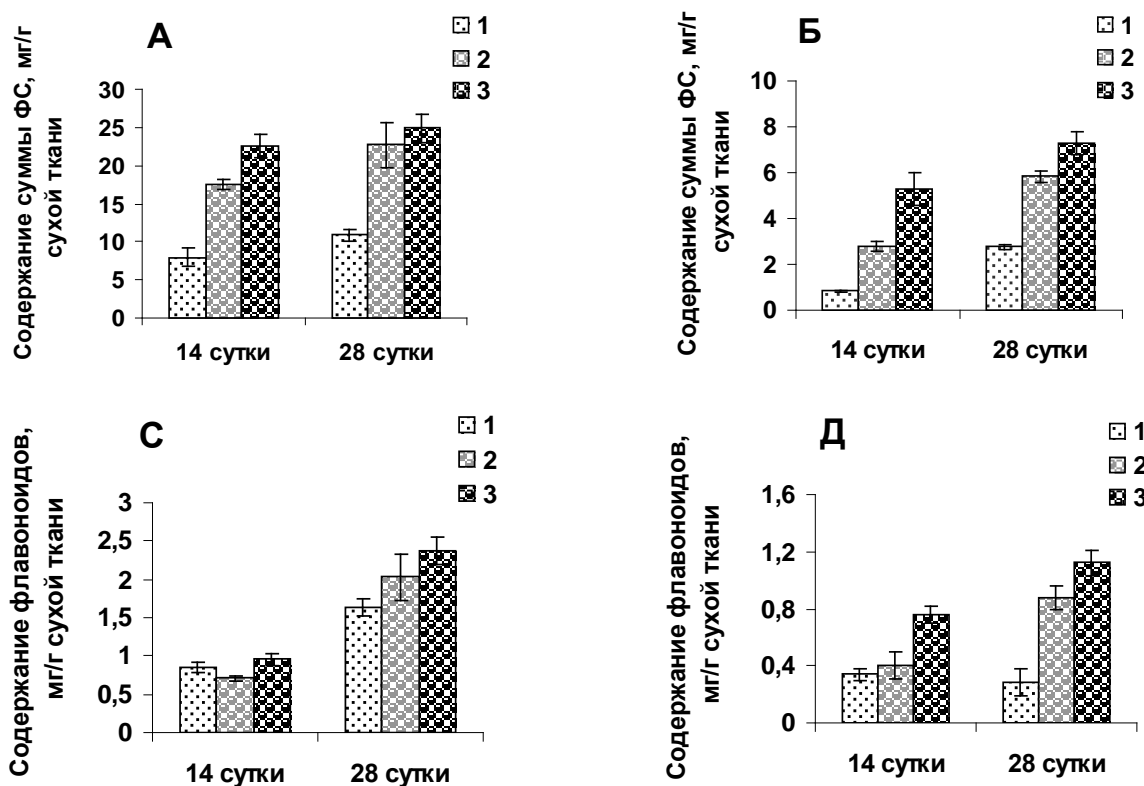
1 – свободные клетки, 2 – иммобилизованные клетки в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных капсулах,  
3 – иммобилизованные клетки в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых капсулах

Рисунок 1 – Кривые роста свободных и иммобилизованных клеток *Catharanthus roseus* (А) и *Vinca minor* (Б)

Таким образом, включение поликатионного полисахарида хитозана в состав полимерного матрикса приводит к замедлению ростовых процессов и более раннему выходу на стационарную фазу роста клеток, что, вероятно, связано с ингибирующим действием исследуемого гликана на процессы первичного метаболизма. Как известно, иммобилизованные клетки в целом характеризуются замедленным ростом благодаря

удлинению стационарной фазы роста, что позволяет стабилизировать метаболические процессы, а также повысить длительность функционирования клеток суспензионных культур [1].

При изучении содержания суммы фенольных соединений в свободных и иммобилизованных клетках было показано, что иммобилизация в целом стимулирует накопление данного класса вторичных метаболитов, по сравнению со свободными клетками в 2,1–2,8 раза для *Catharanthus roseus* и в 2,1–6,4 раз для *Vinca minor* (рисунок 2А, Б). Максимальный стимулирующий эффект был установлен при использовании  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых полиэлектrolитных комплексов. Так, на 14-е сутки культивирования содержание фенольных соединений в свободных клетках составляло  $7,93 \pm 1,24$  и  $0,83 \pm 0,03$  мг/г сухого вещества для *Catharanthus roseus* и *Vinca minor*, соответственно. При инкапсулировании клеток в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатные капсулы накопление суммы фенольных соединений достигало  $17,54 \pm 0,61$  и  $2,80 \pm 0,22$  мг/г сухого вещества для *Catharanthus roseus* и *Vinca minor*, соответственно. Иммобилизация клеток суспензионных культур в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах приводила к стимуляции накопления фенольных соединений и составляла  $22,52 \pm 1,51$  для *Catharanthus roseus* и  $5,30 \pm 0,69$  мг/г сухого вещества для *Vinca minor*.



1 – свободные клетки, 2 – иммобилизованные клетки в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных капсулах,  
3 – иммобилизованные клетки в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых капсулах

Рисунок 2 – Влияние иммобилизации на содержание суммы ФС (фенольных соединений) (А, Б) и флавоноидов (В, Г) в клетках *Catharanthus roseus* (А, В) и *Vinca minor* (Б, Г)

На 28-е сутки инкубации разница в накоплении фенольных соединений между клетками суспензионной культуры *Vinca minor* и иммобилизованными в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных и  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах была менее существенной. Достоверных различий между содержанием фенольных соединений в клетках *Catharanthus roseus*, иммобилизованных в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных и  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах, на 28-е сутки инкубации установлено не было.

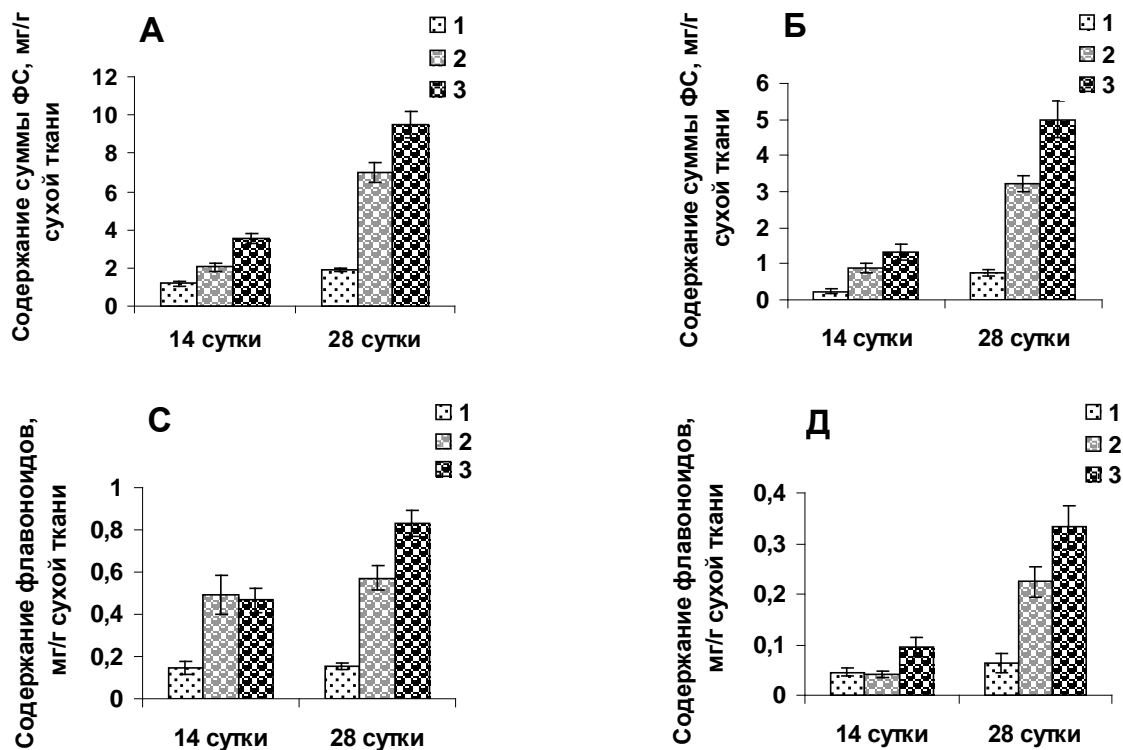
Инкапсулирование в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах также стимулирует накопление флавоноидов на 14-е сутки в клетках *Catharanthus roseus* и на 14-е и 28-е сутки

роста в клетках *Vinca minor* по сравнению с иммобилизованными клетками в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных гранулах (рисунок 2С, Д). На 14-е сутки культивирования содержание флавоноидов в суспензионных клетках *Vinca minor* составляло  $0,34 \pm 0,04$  мг/г сухой ткани, а в иммобилизованных в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных и  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах –  $0,40 \pm 0,09$  и  $0,76 \pm 0,06$  мг/г сухой массы, соответственно. Максимальное содержание флавоноидов было показано в инкапсулированных клетках в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах на 28-х сутках культивирования ( $1,12 \pm 0,08$  мг/г сухой ткани). При этом на 28-е сутки культивирования клеток *Catharanthus roseus* между накоплением флавоноидов в свободных и иммобилизованных в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных гранулах клетках, а также между клетками инкапсулированными в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных и  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах достоверных различий установлено не было.

Как уже упоминалось выше, характерной особенностью иммобилизованных в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатном геле клеток является спонтанная экскреция продуктов вторичного метаболизма [2–4, 9]. Например, экскреция в среду инкубации антрахинона иммобилизованными клетками культуры *Crusilata glabra* увеличивалась в 34 раза по сравнению со свободными клетками культуры [12]; иммобилизация стимулировала экскрецию монотерпеновых индольных алкалоидов в среду инкубации в культурах клеток и протопластов *Catharanthus roseus* [2, 4, 13].

В результате наших экспериментов было установлено, что максимальную экскрецию фенольных соединений и флавоноидов в среду культивирования вызывает иммобилизация клеток в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах на 28-е сутки культивирования (рисунок 3А, Б). Так, содержание суммы фенольных соединений в среде инкубации свободных клеток на 28-е сутки составляло  $1,89 \pm 0,11$  для *Catharanthus roseus* и  $0,75 \pm 0,07$  мг/г сухого вещества и *Vinca minor*. При инкапсулировании в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатный гель накопление суммы фенольных соединений в среде инкубации клеток *Catharanthus roseus* достигало  $6,99 \pm 0,55$ , а *Vinca minor* –  $3,21 \pm 0,22$  мг/г сухого вещества, соответственно. В то время как при иммобилизации клеток суспензионных культур в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах экскреция фенольных соединений составляла  $9,51 \pm 0,68$  и  $5,01 \pm 0,53$  мг/г сухого вещества для *Catharanthus roseus* и *Vinca minor*, соответственно (рисунок 3А, Б).

Аналогичная закономерность также была продемонстрирована и при изучении спонтанной экскреции флавоноидов свободными и иммобилизованными клетками *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* на 28-е сутки культивирования (рисунок 3С, Д). Содержание флавоноидов в среде инкубации свободных клеток на 28-е сутки составляло  $0,15 \pm 0,01$  для *Catharanthus roseus* и  $0,06 \pm 0,02$  мг/г сухого вещества для *Vinca minor*. При инкапсулировании клеток в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатные гели содержание данных соединений в среде достигало  $0,57 \pm 0,06$  и  $0,22 \pm 0,03$  мг/г сухого вещества для *Catharanthus roseus* и *Vinca minor*, соответственно. При иммобилизации клеток суспензионных культур в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах экскреция флавоноидов была максимальной (*Catharanthus roseus* –  $0,83 \pm 0,06$ , *Vinca minor* –  $0,33 \pm 0,04$  мг/г сухого вещества, соответственно). При этом на 14-е сутки культивирования клеток *Catharanthus roseus* достоверных различий в содержании флавоноидов в среде инкубации иммобилизованных в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных и  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых гранулах клеток установлено не было.



1 – свободные клетки, 2 – иммобилизованные клетки в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных капсулах,  
3 – иммобилизованные клетки в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых капсулах

Рисунок 3 – Влияние иммобилизации на содержание суммы фенольных соединений (А,Б) и флавоноидов (В,Д) в среде культивирования клеток *Catharanthus roseus* (А,В) и *Vinca minor* (Б,Д)

Влияние иммобилизации на внутриклеточный метаболизм является сложным и многокомпонентным процессом. Несмотря на то, что иммобилизация в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатном и  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановом гелях характеризуется мягкими условиями, тем не менее, заключение клеток в полимерный матрикс может являться стрессовым фактором. Иницируемая иммобилизацией стрессовая реакция клетки, вероятно, может приводить к активации сигнальных каскадов, в ряде случаев стимулируя синтез вторичных метаболитов [2]. При иммобилизации растительных клеток альгинат, вероятно, выступает как элиситор-подобная субстанция [14], проявляющая свой эффект, возможно, через взаимодействие с рецептором. Высказывается мнение о локализации на клеточной мембране рецепторов для распознавания элиситоров типа олигосахаридов [2].

Включение хитозана в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановый матрикс, вероятнее всего, оказывает эффект на экскрецию продуктов вторичного метаболизма клеток благодаря активации процессов пермеабиллизации. Выявлено, что внесение хитозана в концентрации 20-500 мкг/мл в среду культивирования свободных клеток *Glycine max* индуцирует выход из клеток электролитов, белков и других метаболитов [15]. Аналогичный эффект отмечен при обработке клеток *Chenopodium rubrum* хитозаном [16]. Предполагается, что данный поликатионный полисахарид индуцирует формирование пор только в плазматической мембране культур *in vitro*. Другими исследователями было продемонстрировано стимулирующее влияние иммобилизации клеток суспензионной культуры *Apium graveolens* в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных гранулах или каррагинане, поверхностно сшитых хитозаном, на прирост биомассы, уровень дыхания и общее содержание белка по сравнению с клетками иммобилизованными в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатных гранулах или каррагинане без хитозановой оболочки [17].

Одним из механизмов, по которому кальций оказывает влияние на физиологические параметры клеток растений в процессе иммобилизации определяется его высвобождением из

полисахаридного матрикса и активацией  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов плазматической мембраны [2]. Высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  также было продемонстрировано и при обработке хитозаном суспензионных клеток *Glycine max* меченным  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Наблюдалось быстрое высвобождение кальция в основном из клеточной стенки и/или цитоплазматической мембраны, которое завершалось гораздо раньше, чем индуцируемая хитозаном утечка внутриклеточных электролитов [18].

### Выводы

Инкапсулирование клеток суспензионных культур *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых носителях по сравнению с  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинатными гранулами приводит, с одной стороны, к замедлению процессов роста, с другой - к стимуляции процессов синтеза и экскреции фенольных соединений в среду инкубации. Снижение процессов роста культуры является положительным моментом, поскольку повышает длительность функционирования клеток суспензионных культур при их использовании в производственных условиях.

Высокая спонтанная экскреция общей суммы фенольных соединений и флавоноидов в среду культивирования отмечается при иммобилизации клеток суспензионных культур исследуемых растений в  $\text{Ca}^{2+}$ -альгинат-хитозановых капсулах на 28-е сутки инкубации.

Таким образом, образующиеся при взаимодействии поликатионита хитозана и полианионита альгината полиэлектролитные сетки являются перспективными носителями и их физико-химические свойства оказывают положительное влияние на продуктивность суспензионных культур. Для используемых носителей характерно отсутствие цитотоксичности, биодоступность, совместимость с биосистемами, биоразлагаемость с образованием нетоксичных низкомолекулярных соединений.

*Авторы выражают глубокую признательность к.б.н., вед. научному сотруднику НИЛ прикладных проблем биохимии – Курченко В.П. за предоставление препаратов хитозана.*

### Список литературы

1. Brodelius, P. Immobilized plant cells / P. Brodelius, K. Mosbach // Adv. Appl. Microbiol. – 1982. – Vol. 28. – P. 1–18.
2. Юрин, В. Иммобилизованные клетки лекарственных растений / В. Юрин. – Германия. : LAP LAMBERT. Academic Publishing, 2014. – 136 с.
3. Brodelius P. Immobilized plant cells for the production and transformation of natural product / P. Brodelius, B. Deus, K. Mosbach, M.N. Zenk // FEBS Letters. – 1979. – Vol. 103. – P. 93–97.
4. Юрин, В.М. Иммобилизация – эффективный прием повышения синтеза биологически активных веществ в суспензионной культуре растительных клеток / В.М. Юрин, С.Н. Ромашко, О.В. Молчан, Т.И. Дитченко // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2010. – Т. 5, ч. 1. – С.191–199.
5. Скрыбин, К.Г. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / К.Г. Скрыбин, Г.А. Вихорева, В.П. Варламов. – М.: Изд-во Наука. – 2002. – 368 с.
6. Polk, A. Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules / A. Polk, B. Amsden, K. De Yao, T. Peng, M.F.A. Goosen // J. Pharmaceutical Science. – 1994. – Vol. 83 (2). – P. 178–185.
7. Liu, L.S. The potential application of alginate/chitosan porous microsphere loaded with interleukin-2 in tumour immunotherapy / Liu L.S., Liu S.Q., Ng S., Heller J., Froix M. // Proceed. Intern. Symb. Control. Rel. Bioact. Mater. – 1995. – Vol. 22. – P. 542–543.
8. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: its applications and production / A. Junaid [et al.] // Pharmacie Globale (IJCP). – 2010. – Vol. 1 (4). – P. 1–16.

9. Cytotoxicity of *Vinca minor* / M. Khanavi1 [et al.] // Pharmaceutical biology. – 2010. – Vol. 48. – P. 96–100.
10. Middleton, E.Jr. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer / E.Jr. Middleton, C. Kandaswami, T.C. Theoharides // Pharmacol. Rev. 2000. – V.52 (4). – P.673–751
11. Запрометов, М.Н. Биохимические методы анализа растений / М.Н. Запрометов. – Москва: Иностранная литература, 1960. – 592 с.
12. Evaluation of immobilization effects on metabolic activities and productivity in plant cell processes / H. Dörnenburg // Process Biochemistry. – 2004. – Vol. 39. – P. 1369–1375.
13. Юрин, В.М. Регуляторное действие полисахаридных носителей на синтез вторичных метаболитов в иммобилизованных растительных клетках / В.М. Юрин, Т.И. Дитченко, О.В. Молчан, С.Н. Ромашко // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – С. 211–218.
14. Endogenous elicitor-like effects of alginate on physiological activities of plant cells / C. Akimoto [et al.] // Appl. Microbial. Biotechnol. – 1999. – Vol. 52. – P. 429–436.
15. Young, D.H. Effect of Chitosan on Membrane Permeability of Suspension-Cultured Glycine max and Phaseolus vulgaris Cells. Plant Physiol. / D.H. Young, H. Köhle, H. Kauss. – 1982. – Vol. 70 (5). P. 1449–1454.
16. Dornenburg, H. Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures / H. Dornenburg, D. Knorr // Food Technol. – 1997. – Vol. 51. – P. 47–54.
17. Beaumont, M. Chitosan immobilization and permeabilization of cultured apium graveolens, chenopodium rubrum, and daucus carota cells / Beaumont M., Pandya Y., Knorr D. // Food Biotechnology. – 1989. – Vol. 3 (1). – P. 71–87.
18. Young, D.H. Release of calcium from suspension cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations, and polyamines in relation to effects on membrane permeability / D.H. Young, H. Kauss // Plant Physiol. Nov. – 1983. – Vol. 73(3). – P. 698–702.